

茶叶科学 2008, 28 (6): 20~26
Journal of Tea Science

HPLC-APCI-MS 法测定茶叶中的茶氨酸

王虹^{1,3}, 康海宁^{1,2}, 陈军辉^{1*}, 赵恒强¹, 王小如^{1,2}, 黎先春¹

(1. 国家海洋局第一海洋研究所青岛市现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061; 2. 厦门大学化学化工学院化学系 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 3. 上海水产大学生命学院, 上海 200090)

摘要: 采用高效液相色谱-大气压化学电离质谱 (HPLC-APCI-MS) 联用技术, 建立了茶叶中茶氨酸的含量测定方法。实验采用 C₈ 柱, 以甲醇-水为流动相, 等度洗脱, 采用正离子大气压化学电离质谱 (SIM 模式) 进行测定, 可以获得稳定的质谱信号, 并采用正交实验设计对 APCI-MS 仪器条件进行了优化。结果表明, 本文建立的 HPLC-APCI-MS 方法操作简便、重现性好, 灵敏度较紫外检测器有很大的提高, 可用于微量茶氨酸的快速测定。

关键词: 茶叶; 茶氨酸; 高效液相色谱-大气压化学电离质谱; 选择离子监测模式; 正交实验

中图分类号: TS272; O6657.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-369X(2008)06-020-07

Determination of Theanine in Tea by High Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry

WANG Hong^{1,3}, KANG Hai-ning^{1,2}, CHEN Jun-hui^{1*}, ZHAO Heng-qiang¹,
WANG Xiao-ru^{1,2}, Frank Sen-Chun Lee¹

(1. QingDao Key Lab on Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicines, First Institute Oceanography of SOA, Qingdao 266061, China; 2. Department of Chemistry and the Key Laboratory of Analytical Science of the MOE, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: HPLC coupled online with atmospheric pressure chemical ionization MS technique was developed for the qualitative and quantitative determination of theanine in tea. The theanine and other compounds in the tea extract were separated on an Alltima C₈ column with methanol and water (10:90 v/v) as mobile phase, with flow rate of 0.6 ml/min and APCI-MS SIM m/z 175.1 detection. In the positive APCI mode, sensitive and stable MS signal could be obtained by APCI-MS (SIM m/z 175.1) detection, and the APCI-MS conditions were also optimized by orthogonal design. The results indicated that HPLC-APCI-MS method was simple, sensitive and reliable for the determination of theanine in tea. It was important that the detection sensitivity was improved greatly by APCI-MS than UV. Eight tea samples from Fujian province were analysed using the established methods.

Keywords: tea, theanine, HPLC-APCI-MS, SIM mode, orthogonal experiment

收稿日期: 2008-06-26

修订日期: 2008-09-08

基金项目: 福建省科技厅茶叶指纹图谱质量控制研究项目 (2006N0043) 和海洋一所基本科研业务专项 (GY-022008T32) 资助。

作者简介: 王虹 (1978—), 女, 新疆阿克苏人, 硕士, 主要从事天然产物分析化学研究。*通讯作者。

茶氨酸(N-乙基- γ -谷氨酰胺, theanine)是茶叶特有的一种氨基酸,是绿茶的呈味物质^[1]。茶氨酸可分解为L-谷氨酸和乙胺。茶氨酸在绿茶中占游离氨基酸总量的40%~60%,是茶叶中含量最多的氨基酸,在高级绿茶中含量丰富,一般占干茶含量的1%~2%^[2]。国内茶叶工作者一直公认茶氨酸的含量与茶叶品质和等级呈正相关($r=0.787\sim 0.876$)并把它作为评价绿茶品质的重要指标^[3]。药理学研究表明,茶氨酸能拮抗咖啡碱引起的神经系统的兴奋作用、降血压、保护神经细胞、增强抗癌药物的疗效、抑制癌细胞浸润、减肥等作用^[4]。

茶氨酸的分析方法主要有,茚三酮显色的薄层色谱法、气相色谱法、液相色谱法^[5]和胶束电动毛细管色谱法^[6]等。因茶氨酸无荧光特性、紫外吸收较弱,在近年来出现较多的液相色谱法中,均要经过衍生后采用荧光或紫外检测器检测^[2,7,8],使得试样处理操作繁琐、干扰因素较多。国内多使用氨基酸分析仪测定茶氨酸^[9],但这种方法不能一次性分离茶氨酸和其它18种氨基酸,因而需采用二次分离。对于未衍生化方法测定茶氨酸的高效液相色谱法,李银花等人^[4]建立了高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定茶叶中的茶氨酸,朱小兰^[10]等建立了高效液相色谱-紫外检测器测定茶叶中茶氨酸含量的方法,但是不经衍生化处理方法的灵敏度较低,采用质谱作检测器测定茶氨酸的研究未见报道。本文建立了HPLC-APCI-MS测定茶叶中茶氨酸的方法,并对紫外检测和大气压化学电离质谱检测进行了比较。

1 研究方法

1.1 仪器与试剂

1100型高效液相色谱仪,配有DAD检测器、自动进样器等(美国Agilent公司);大气压化学电离源,单四极杆质谱仪(美国Agilent公司),Alltech C₈色谱柱(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm), Zorbax Bonus-RP C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m, Agilent), Milli-Q超纯水

系统(美国Millipore公司),恒温水浴锅,0.45 μ m水相滤膜。茶氨酸(L-theanine)标准品(购于美国TCI公司),色谱纯甲醇、乙腈(购于美国Tedia公司),实验所用超纯水均为自制。

1.2 供试品及标准品溶液制备

准确称取0.5 g茶叶于100 ml锥形瓶中,加入50 ml超纯水,在90 $^{\circ}$ C水浴锅中加热10 min,取出后放置至室温,用定性滤纸过滤除去茶渣,取滤液过0.45 μ m水相滤膜,待测。

准确称取20.6 mg茶氨酸(L-theanine)标准品于10 ml棕色容量瓶中,加超纯水溶解,定容至刻度,得质量浓度为2.06 g/L的标准储备液。分别移取一定体积的储备液于10 ml容量瓶中,用水稀释定容,配制成系列标准溶液。

1.3 色谱与质谱条件

Alltech C₈色谱柱(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm),流动相10%的甲醇水溶液,等度洗脱,流速为0.6 ml/min,进样量20 μ l,紫外检测波长210 nm,室温(25 $^{\circ}$ C)。

大气压化学电离(APCI)源,正离子模式检测,喷雾气压 1.38×10^5 Pa,干燥气(N₂)流速3.0 L/min,干燥气体温度300 $^{\circ}$ C,气化室温度为300 $^{\circ}$ C,毛细管电压3 000 V,电晕放电电流4.0 μ A,破碎电压(Fragmentor) 40 V;全扫描(Scan)质荷比(m/z)范围为100~800,选择离子监测(SIM)模式,选择质荷比(m/z)为175.1的离子作监测离子。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

用大气压化学电离质谱检测定性茶氨酸,考察了茶氨酸在C₈及C₁₈柱上的分离情况,由于茶氨酸的极性较大,在反相柱上的保留时间较短,在C₁₈柱上尤其明显,当流速为0.6 ml/min时,茶氨酸的保留时间在3 min左右(图1A),抗干扰能力很差,不适合茶氨酸的分析。在相同条件下,茶氨酸在C₈柱上的保留时间适中,且能与其它物质分开(图1B)。文献^[10]

中报道采用 0.05% 三氟乙酸水溶液为流动相在 C_{18} 柱上分离测定茶氨酸, C_{18} 柱是以非极性的烷基硅烷键合相为柱填料的, 采用高比例的水相冲洗, 对柱子的损害较大。本实验使用的 Alltima C_8 柱填料同样是非极性的烷基硅烷

键合材料, 提高流动相中有机相的组成比例, 采用 10% 甲醇为流动相, 对柱子的损害较小, 可以延长柱子的使用寿命, 茶氨酸的保留时间在 6.5 min 左右, 且能与茶叶中其它物质完全分开。

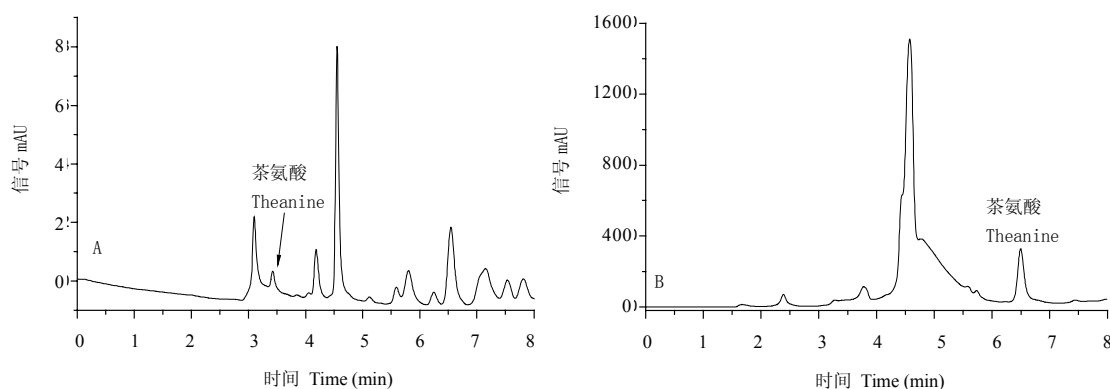


图 1 C_{18} 柱 (A) 和 C_8 (B) 柱对茶氨酸分离的影响

Fig. 1 Effect of C_{18} (A) and C_8 (B) column on separation of theanine

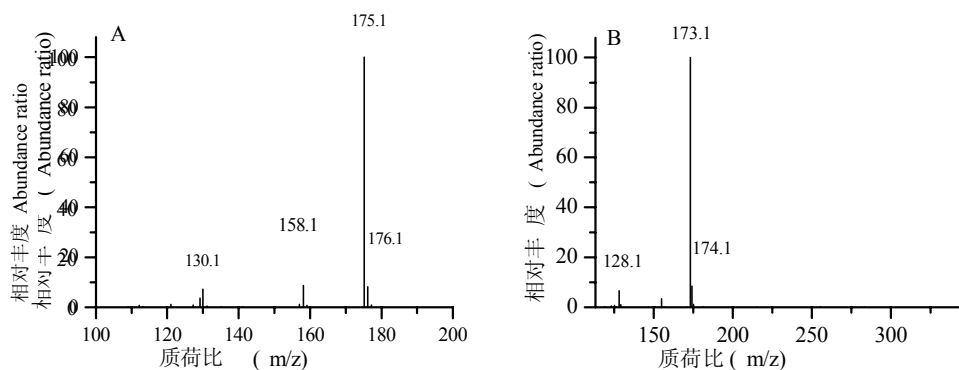


图 2 茶氨酸质谱图

Fig. 2 Mass spectra of theanine

注: (A) 正离子模式, (B) 负离子模式。Note: (A) in positive mode, (B) in negative mode.

2.2 茶氨酸的 APCI-MS 分析

在全扫描正、负离子两种电离模式下, 标准品不经液相色谱柱分离直接进样, 对茶氨酸进行了 APCI-MS 分析研究。结果表明: 茶氨酸在正、负离子电离模式下均有信号响应 (图 2), 但负离子电离方式下检测的稳定性不及正离子模式, 故选择正离子电离方式。茶氨酸的分子质量为 174.1, 结构式为

$\text{HOOCCHNH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_3$, 从图 2 (A) 可以看到, m/z 175.1 的峰为茶氨酸的准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 158.1 和 130.1 的峰分别为其去掉一个 $-\text{OH}$ 基团 (m/z 17) 和一个 $-\text{COOH}$ 基团 (m/z 45) 得到的碎片离子峰。在进行 HPLC/APCI-MS 联机分析时, 选择 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 175.1) 作为 SIM (Select Ion Monitoring) 测定时的监测离子。

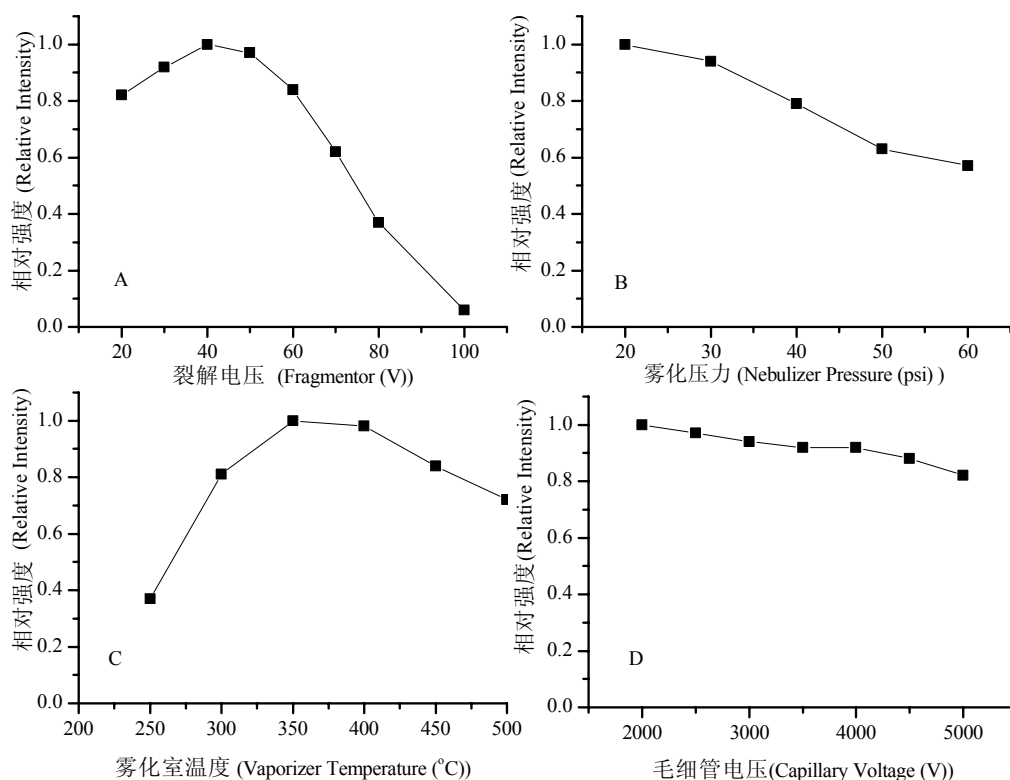


图 3 不同 APCI-MS 参数对测定灵敏度的影响

Fig. 3 Effects of different APCI-MS instrument parameters on the detection sensitivity

注: A: 裂解电压; B: 雾化压力; C: 雾化室温度; D: 毛细管电压。

Note: A: Fragmentor; B: Nebulizer Pressure; C: Vaporizer Temperature; D: Capillary Voltage.)

2.3 质谱条件的优化

2.3.1 质谱条件对测定结果的影响

考察了 8 个不同的裂解电压对茶氨酸检测灵敏度的影响, 结果见图 3A; 当裂解电压为 40 V 时, 茶氨酸有最高的质谱响应信号; 裂解电压太低, 不易形成 $[M+H]^+$ 峰, 裂解电压太高, 形成的分子离子碎片太多, 大大降低了准分子离子峰 $[M+H]^+$ 的强度, 不利于定量测定, 因此, 选用裂解电压为 40 V。比较了干燥气的流速分别为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0 L/min 和 7.0 L/min 时对质谱响应信号的影响, 结果表明, 当干燥气流速在 3.0~5.0 L/min 范围内, 茶氨酸的质谱响应信号较大, 综合考虑, 进行正交实验以确定最佳干燥气流速。考察了不同雾化压

力对质谱响应信号的影响, 结果见图 3B; 随着雾化压力的增大, 茶氨酸的质谱检测信号逐渐减小, 综合考虑, 进行正交实验以确定最佳雾化压力。研究比较了干燥气温度分别为 200、250、300、325°C 和 350°C 时对茶氨酸质谱响应信号的影响, 结果表明, 干燥气温度对茶氨酸质谱响应信号的影响并不显著, 故选择仪器默认干燥气温度 300°C。比较了不同雾化室温度对茶氨酸质谱响应信号的影响, 结果见图 3C; 茶氨酸质谱响应信号随着雾化室温度的升高而升高, 当雾化器温度超过 350°C 时, 茶氨酸的质谱响应信号反而有所降低, 综合考虑, 进行正交实验以确定最佳雾化室温度。此外还考察了毛细管电压对信号灵敏度的影响, 图 3D

结果表明,茶氨酸的质谱响应信号随着毛细管电压的升高而降低,综合考虑,进行正交实验以确定最佳毛细管电压。

2.3.2 茶氨酸质谱检测正交实验优化

在正离子电离模式下,裂解电压为 40 V,干燥气温度 300℃,选择干燥气流速、雾化压力、雾化器温度、毛细管电压为考察因素,以茶氨酸的质谱检测峰面积为指标,选用正交表 $L_9(3^4)$ 对质谱参数进行优化,正交实验设计及结果见表 1。

表 1 表明,干燥气流速、雾化压力、雾化器温度、毛细管电压对茶氨酸质谱响应信号(以峰面积计算)的影响表现出明显的差别,其影响因素按从大到小的顺序排列依次为:雾化压力>雾化器温度>毛细管电压>干燥气流速。优选参数为 $A_1B_1C_1D_2$,即干燥气流速为 3.0 L/min,雾化压力为 1.38×10^5 Pa,雾化器温度为 300℃,毛细管电压为 3 000 V。为验证 $A_1B_1C_1D_2$ 组合的正确性,按此组合做 6

次重复实验,结果表明,同浓度的茶氨酸标准品的质谱检测峰面积为 229110, RSD 为 1.7%。

2.4 抗干扰能力

图 4A 是茶氨酸标准品的色谱图,与绿茶样品(春茶 1)的色谱图(图 4B)对照,可知保留时间 $t=6.508$ min 的峰为茶氨酸,图 4C 是绿茶样品(春茶 1)的大气压化学电离质谱检测总离子流图,在总离子流图中保留时间 $t=6.597$ min 的峰的两侧和峰中心得出的质谱图完全一致,且该峰的质谱图与茶氨酸标准品的质谱图(图 2)完全一致,表明此条件下样品中其它成分对茶氨酸的分析无干扰,对其定量是可行的。

2.5 标准工作曲线的绘制及检出限

将 1.2 中配制好的系列标准溶液直接进样分析,以茶氨酸标准品的质量浓度为横坐标 $X(\text{mg/L})$,峰面积 Y 为纵坐标标准曲线,得到紫外检测和大气压化学电离质谱检测茶氨酸的线性回归方程和线性范围见表 2。从表 2 可

表 1 正交实验设计表与结果

Table 1 Factors in the orthogonal design for the optimization of APCI-MS conditions

序号 (Run no.)	干燥气流速 Gas flow(L/min)	喷雾器压力(Pa) Nebulizer pressure	干燥气温度(℃) Vaporizer Temperature	毛细管压力(v) Capillary voltage	峰面积 Peak area
1	1	1	1	1	228733
2	1	2	2	2	182435
3	1	3	3	3	110859
4	2	1	2	3	173942
5	2	2	3	1	160302
6	2	3	1	2	164908
7	3	1	3	2	170209
8	3	2	1	3	174827
9	3	3	2	1	119218
K1	522027	572885	568469	508253	
K2	499152	517564	475594	517552	
K3	464254	394985	441371	459628	
k1	174009	190962	189490	169418	
k2	166384	172521	158531	172517	
k3	154751	131662	147124	153209	
R	19258	59300	42366	19308	
最优水平 (Optimal level)	A1	B1	C1	D2	

注: K1、K2、K3 为水平值总和, k1、k2、k3 为水平均值, R 为极值。

Note: K1、K2、K3 is summation of level value, k1、k2、k3 is level value, R is extreme value.

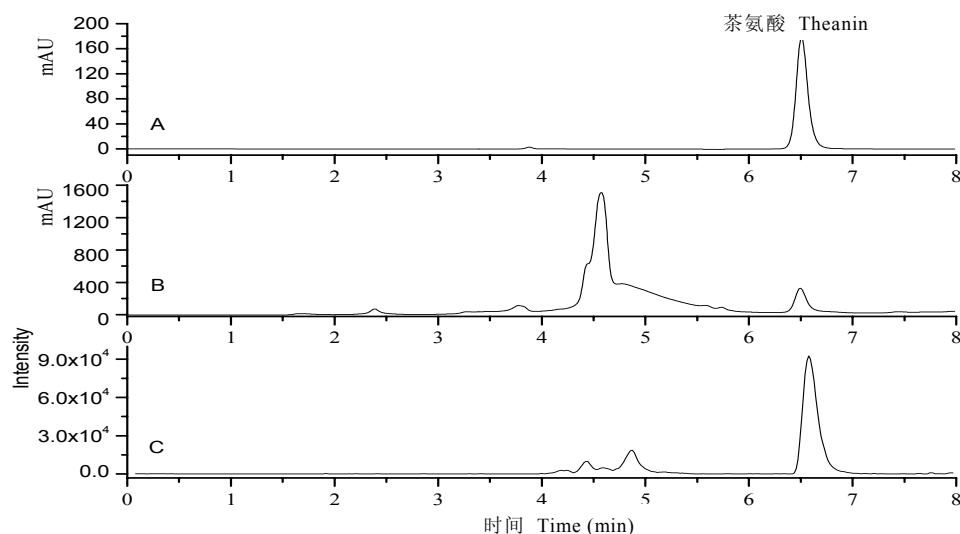


图 4 茶氨酸标准品色谱图和茶叶样品色谱及质谱总离子流图

Fig. 4 Chromatogram of theanine standard, tea sample and MS total ion chromatogram of tea sample

注: (A) 茶氨酸标准品色谱图, (B) 绿茶样品色谱图, (C) 绿茶样品质谱总离子流图。

Note: (A) HPLC-UV chromatogram of theanine standard, (B) HPLC-UV chromatogram of green tea sample, (C) MS total ion chromatogram (TIC) of green tea sample.

知,采用大气压化学电离质谱检测对茶氨酸的定量线性范围较紫外检测宽,适合在较低浓度范围内进行定量,而采用紫外检测对茶氨酸的定量宜在高浓度范围内进行。将标准溶液稀释进样,测其峰高响应值及基线噪音强度,以三倍信噪比计算检出限。紫外 210 nm 检测茶氨酸的检出限为 2.1×10^{-9} g, 大气压化学电离质谱 SIM 模式检测茶氨酸的检出限为 2.0×10^{-14} g, 可知采用 APCI-MS 测定茶氨酸检测的灵敏度提高了 5 个数量级。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度

取浓度为 20.6 mg/L 的茶氨酸标准溶液,重复进样 6 次,记录各次的峰面积和保留时间,计算其峰面积的 RSD 值,两种检测器测得的结果 RSD 值均小于 2.36%,保留时间的 RSD 值为 0.07%,这表明仪器的精密度良好。

2.6.2 重现性

以福建绿茶为供试样本,按 1.2 样品处理

方法平行制备 6 份,按照样品测定方法进行分析,测得茶氨酸色谱峰的峰面积,分别计算其相对标准偏差,UV 检测器峰面积的 RSD 值为 2.3%,APCI-MS 检测器峰面积的 RSD 值为 5.3%,保留时间的 RSD 值均小于 0.49%,表明两种检测方法重现性良好。

2.6.3 回收率

精密称取已知含量的茶样 6 份,每两个样品为一组,加入 3 个浓度水平的茶氨酸标准品,样品按 1.2 方法进行处理,按照样品测定的方法进行分析,平均加标回收率为 96.8%,RSD 为 5.57%,表明本方法的回收率较高。

2.7 茶叶样品中茶氨酸的含量测定

采用建立的 HPLC-APCI-MS 对 8 个福建绿茶样品中茶氨酸含量进行了测定,并采用紫外检测器进行了对比,结果见表 3。由表 3 可知,APCI-MS 对茶氨酸的定量结果与 UV 的结果相当,在实际样品测定中,APCI-MS 则可用于痕量茶氨酸的检测。从表 3 中 4 个春茶

和 4 个秋茶样品的茶氨酸测定结果可知,春茶 中茶氨酸的含量普遍比秋茶高。

表 2 不同方法检测茶氨酸的线性回归方程及线性范围
Table 2 Calibration curve, linear range of theanine determined by HPLC-UV and HPLC-APCI-MS assay

检测器 Detector	线性回归方程 Linear regression equation	R ₂	线性范围 Linear range
UV	Y=12.163X+49.961	0.9990	0.02~103 μg
APCI-MS	Y=124137X-10565	0.9998	0.02 ng ~4 μg

表 3 茶叶样品中茶氨酸含量测定结果
Table 3 Contents of theanine in different tea samples from Fujian province (n=3)

样品		茶氨酸含量(%)		相对标准偏差	茶氨酸含量(%)		相对标准偏差
Sample		Content of theanine		RSD(%)	Content of theanine		RSD(%)
		UV			APCI-MS		
春茶	Spring tea	1	2.12	1.1	2.07		2.0
		2	1.38	2.0	1.33		3.4
		3	1.07	2.2	1.09		3.5
		4	1.27	0.9	1.15		6.2
秋茶	Autumn tea	1	0.45	1.0	0.46		4.4
		2	0.84	1.3	0.88		4.6
		3	0.46	2.9	0.50		5.0
		4	0.87	2.0	0.92		6.0

3 总结

本文所建立的 HPLC-APCI-MS 分离测定茶叶中茶氨酸含量的方法,采用 C₈ 反相柱代替 C₁₈ 柱,以 10%的甲醇水溶液作为流动相等度洗脱,在不需对茶氨酸进行衍生化的条件下,即可对茶叶中的茶氨酸进行高灵敏度快速测定;采用大气压化学电离质谱 SIM 模式检测茶氨酸的检出限为可达 2.0×10⁻¹⁴ g,较紫外检测器测定茶氨酸的灵敏度提高了 5 个数量级。此方法操作简便、分离效果好、灵敏度高、分析速度快、重现性良好,特别适于微量茶氨酸的快速测定。

参考文献:

[1] 吕毅,郭雯飞,倪捷儿,等. 茶氨酸的生理作用及合成[J]. 茶叶科学,2002,23(1): 1~5.
[2] 高小红,袁华,喻综沅. 茶氨酸的研究进展[J]. 化学与

生物工程,2004,1: 7~9.
[3] 王泽农. 茶叶生物化学[M]. 北京: 农业出版社,1980: 48~56.
[4] 李银花,刘仲华,黄建安,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定茶叶中茶氨酸[J]. 茶叶科学,2005,25(2): 225~228.
[5] 郭升平. 高效液相色谱法测定茶叶中茶氨酸的研究[J]. 色谱,2003,23(6): 464~466.
[6] 李平,宛晓春,李健,等. 茶氨酸的衍生化及毛细管电泳定量技术[J]. 茶叶科学,2004,24(2): 119~123.
[7] Unno T, Suzuki Y, Kaduka T, et al. Metabolism of Theanine, γ-Glutamylethylamide in Rats[J] Journal of Agriculture and food chemistry, 1999, 47(4): 1593~1596.
[8] 朱曙东,赵昇皓. 氨基酸的高效液相色谱分析[J]. 色谱,1994,12(1): 20~24.
[9] 张莉,肖玉霞,方洪钜,等. 广东国宾茶中的氨基酸分析研究[J]. 茶叶,1995,21(2): 20~21.
[10] 朱小兰,陈波,罗旭彪. 高效液相色谱法测定茶叶中的茶氨酸[J]. 色谱,2003,21(4): 400~402.